Pefakit® APC-R Factor V Leiden

pentapharm

REF 502-01 **IVD** **For *in-vitro* Diagnostic Use**

CE

Intended Use and Application
Pefakit® APC-R Factor V Leiden is a plasma based functional assay for the determination of resistance to activated protein C caused by the factor V Leiden mutation (FV:Q^{506}).

Introduction
Activated protein C (APC) resistance is the most frequent hereditary defect associated with deep vein thrombosis. Over 95% of the APC resistance phenotype can be explained by the Factor V Leiden mutation [1,2,3,4,5,6]. This defect is caused by point mutation in the factor V gene resulting in a replacement of the amino acid Arg 506 by a Gln residue [2,3,7]. The heterozygous (het) defect is associated with a 5 to 10 fold, the homozygous (hom) defect with a 50 to 100 fold increased thrombosis risk [5,8,9].
There are two possibilities of detecting factor V (FV) Leiden. Plasma based functional assays identifying the phenotype expression of the defect [1] or genotype determination which can be done by PCR technology [10].

Principle of the Method
Pefakit® APC-R Factor V Leiden is a plasma-based functional clotting assay and differs from other functional APC resistance tests by acting specifically on the prothrombinase complex level. It is based on a FVa-dependent prothrombin activator isolated from snake venom. Robustness and specificity of the assay is enhanced by elimination of possible disturbing influences by factors upstream the coagulation cascade and independency from calcium. Interference from UFH, LMWH and Pentasaccharide in the blood sample is precluded by a heparin inhibitor added to reagents 1 and 2.
Sample plasma is pre-diluted with reagent 4 (dilution plasma) and incubated at 37 °C with FV activator from snake venom (RVV-V from *Daboia russelli*) in order to convert FV into FVa. Coagulation is triggered by the addition of a FVa dependent prothrombin activator from snake venom from *Notechis scutatus* in the absence of calcium. The clotting times are recorded and the ratios (clotting time in the presence of APC/clotting time in the absence of APC) are calculated.

Reagents

Reagent	Content
R1	**APC / RVV-V (+APC) Reagent** (APC, RVV-V, Polybrene, Hepes, BSA) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 2.0 ml of deionized water per vial)
R2	**RVV-V (-APC) Reagent** (RVV-V, Polybrene, Hepes, BSA) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 2.0 ml of deionized water per vial)
R3	**PTA Reagent** (Prothrombin Activator, EDTA, Hepes, BSA) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 4.0 ml of deionized water per vial)
R4	**Dilution Plasma** (Human Plasma, processed) 3 vials (lyophilisate, to be reconstituted in 2.0 ml of deionized water per vial)

Incubate reconstituted solutions R1-R4 in closed vials for 30' at room temperature and swirl gently before use.
Attention: Extended incubation of reagent R4 may – due to its high protein content – cause a phase separation characterized by a clear solution with a fine, whitish layer on its surface. This may be erroneously interpreted as coagulation. Therefore, the reagent must absolutely be brought in its initial homogeneous and slightly cloudy form just before use.

Materials required but not provided
- Deionized water
- Calibrated pipettes (1000–5000 µl)
- Automated or semi-automated coagulation instruments using mechanical or optical detection methods

Note: When using automated or semi-automated coagulation analyzers refer always to manufacturer's operator manual or ask for a detailed adaptation protocol.

Storage and Stability
The test kit may be used up to the expiry date given on the label when stored unopened at 2–8 °C.

Stability of the reagents after reconstitution:

Reagent	Stability	
R1	–20 °C	6 months
	2–8 °C	14 days
	15–25 °C	24 hours (on-board)
R2	–20 °C	6 months
	2–8 °C	14 days
	15–25 °C	24 hours (on-board)
R3	–20 °C	6 months
	2–8 °C	14 days
	15–25 °C	24 hours (on-board)
R4	–20 °C	6 months
	2–8 °C	14 days
	15–25 °C	24 hours (on-board)

Frozen reagents should be thawed at 37 °C and gently mixed before use. Freeze only once.

Quality Controls
Use Pefakit® APC-R Factor V Leiden Controls (REF 502-21) as a control reference for the validation of the assay. Negative control or wild-type (neg) shows normal response to APC whereas heterozygous control (het) shows response to the presence of the heterozygous type of FV: Q^{506} mutation. A control run should be made with each test series.
For preparation, use and interpretation of the controls, refer to the instructions and certified ranges mentioned in the package insert of the corresponding control kit.

Distributeur en France : CRYOPEP 83, rue Yves Montand, 34080 Montpellier

Different clotting times will be obtained with different types of instruments depending on the clot detection principle. If values outside the certified range (ratio) are obtained, a complete check of reagents should be made and the analysis should be repeated. If the problem persists, a complete instrument check should be made and the analysis should be repeated.

Blood Collection and Sample Preparation

The patient should be at rest for 10 min prior sampling. Collect venous blood carefully in either 104 mM or 129 mM sodium citrate (volume ratio 9+1). Mix gently blood and anticoagulant directly after sampling, avoid foam formation. Centrifuge immediately at no less than 2000x g for at least 20 min at room temperature. Take care to avoid contaminations from the platelet layer into plasma when the plasma is separated from the cells. As a general rule hemolytic plasma samples should not be used.
For storage freeze undiluted plasma rapidly at –70 °C in aliquots. Freeze only once. Avoid repeated freezing and thawing cycles. To ensure negligible loss of activity of labile coagulation factors and absence of cryoprecipitate, thawing should be done rapidly (within 5 min) in a water bath at 37 °C. For more information see NCCLS document H21-A2 [11].
Stability of undiluted samples (plasma):

–80 °C	at least 1 year
–20 °C	2 months
2–8 °C	24 hours
15–25 °C	4 hours

Procedure

Prepare reagents and samples as described above. Mix gently thawed sample for homogenization, avoid foam formation. Determine +APC clotting time (clotting time in the presence of Activated Protein C), –APC clotting time (clotting time in the absence of Activated Protein C) and calculate the ratio according to the following scheme:

		+APC	– APC
	Sample or control plasma	30 µl	30 µl
R4	**Dilution Plasma**	20 µl	20 µl
		mix prior to use	mix prior to use
R1	**APC/RVV-V (+APC) Reagent**	50 µl	–
R2	**RVV-V (-APC) Reagent**	–	50 µl
	Incubation	**3 min, 37°C**	**3 min, 37°C**
R3	**PTA Reagent**	50 µl	50 µl
		determine clotting time	determine clotting time
	Ratio calculation	**Ratio =** $\frac{\text{+APC clotting time}}{\text{–APC clotting time}}$	

Interpretation of the test results

Differentiation of homozygous, heterozygous and negative samples is based on the typical ratio ranges measured with genotyped patient plasma samples (see tables below). These ratios may vary depending on laboratory, instrument and lot. Therefore, it is recommended to establish individual ranges and cut-offs for each laboratory and each instrument (if necessary also for each lot) by testing series of known genotyped patient plasmas.

Expected Values

Typical ratio ranges for PCR-genotyped patient plasmas on different devices are shown in the table below.

KC-4/-10 A™ micro		
Genotype FV:Q^{506}	n	Ratio range (min/max)
negative	99	≥ 3.0
heterozygous	166	1.3–1.9
homozygous	25	0.9–1.1

BCS® (Behring Coagulation System)		
Genotype FV:Q^{506}	n	Ratio range (min/max)
negative	143	≥ 3.0
heterozygous	170	1.4–2.2
homozygous	27	0.9–1.1

CA-1500 / CA-7000		
Genotype FV:Q^{506}	n	Ratio range (min/max)
negative	235	≥ 3.0
heterozygous	56	1.5–1.8
homozygous	2	1.0–1.1

ACL 9000™		
Genotyp FV:Q^{506}	n	Ratio range (min/max)
negativ	127	≥ 3.0
heterozygot	119	1.4–2.1
homozygot	24	0.9–1.2

STA® C		
Genotype FV:Q^{506}	n	Ratio range (min/max)
negative	134	≥ 2.9
heterozygous	83	1.3–1.8
homozygous	27	0.9–1.1

AMAX CS-190		
Genotype FV:Q^{506}	n	Ratio range (min/max)
negative	74	≥ 3.0
heterozygous	62	1.2–2.3
homozygous	10	0.9–1.1

When using these tables, following restrictions should be considered:

1. These are examples and **no** reference ranges or cut-offs guaranteed by the manufacturer.
2. Certain interference factors (refer to “Limitations and Interferences”) may cause ratio values which cannot clearly be attributed to a particular genotype, or may lead to clotting times that exceed the maximum admitted detection time of the instrument. In these cases, further investigation by PCR and the determination of individual factors are absolutely essential.

Sensitivity and Specificity

With the samples tested so far Pefakit® APC-R Factor V Leiden provided 100% sensitivity and 100% specificity for carriers of heterozygous and homozygous FV:Q^{506} mutation as determined by BCS® (n=340), KC-4/-10 A™ micro (n=290), CA-1500/CA-7000 (n=293), ACL 9000™ (n=270), STA® C (n=244) and AMAX CS-190 (n=146).
Due to the functional detection technique the assay is supposed to detect other FV mutations leading to APC-R phenotype as well. However their prevalence is very low compared to the FV Leiden mutation.

Accuracy and Reproducibility

With 2 genotyped plasma samples (neg/het) a series of 25 measurements were taken on the same day on 2 different fully automated analytical systems (BCS®, CA-500). Correlation of variance (CV) was determined based on the ratio. For both instruments and plasma genotypes the CV was below 5%.
In a further study on the STA® C analyzer, a series of 10 tests on each of 5 consecutive days were done using a heterozygous and a negative (wild-type) control. The CV of the clotting times and the ratios within each day and over all 5 days was ≤5.0 for the negative control and <3.0 for the heterozygous control.
The values obtained during these 5 days were within the following ranges:

	C1 FV-L Negative Control			C2 FV-L Heterozygous Control		
	+APC(s)	–APC(s)	Ratio	+APC(s)	–APC(s)	Ratio
min	132.9	24.2	5.3	39.2	25.4	1.5
max	166.3	25.7	6.7	42.6	27.7	1.6

Limitations and Interferences

No significant differences are observed when fresh or frozen plasma samples are used. It does neither matter whether buffered or un-buffered citrate plasma is used. There is no significant influence on ratio or test sensitivity in case of Fibrinogen, Prothrombin, FVIII, FX, ATIII, Protein C, or Protein S deficiency (up to 100%) or excess of Fibrinogen, FVIII, ATIII, or TFPI (up to 5 times normal value). Mechanical measurements are neither influenced by the hemolytic blood samples nor by samples containing platelet residues. In contrast, optical methods can be influenced by the use of hemolytic or lipemic plasmas. Lupus anticoagulant antibodies did not influence the test. But a high Factor V deficiency (<50%) may lead to strongly elevated clotting times and thus may lead to loss of discrimination performance. The presence of Aprotinin (which inhibits the APC used in this test) and Protamine in the patient's blood can considerably shorten the clotting times, which may also lead to loss of discrimination power.
Due to the addition of Polybrene the prescribed assay procedure allows for the analysis of plasma from anticoagulated patients at heparin levels ≤2 IU/ml (UFH and LMWH) or pentasaccharide levels ≤2 µg/ml. The effect of direct thrombin inhibitors such as Hirudin or Argatroban is not inhibited by Polybrene. Hirudin in the patient plasma has a strong effect on clotting times and thus precludes proper discrimination of the different genotypes.
Therefore, after treatment of patients with Aprotinin, Protamine or direct thrombin inhibitors, it is recommended to either wait at least 24 hours before blood sampling for the test, or determine the FVL by a PCR method.

Precautions

Each donor unit used in the preparation of Dilution Plasma (R4) has been tested for antibodies against HIV Type 1 and 2, Hepatitis C-Virus antibodies, Treponema pallidum antibodies as well as Hepatitis B surface-antigen and Hepatitis C genome by PCR. The tests used are all CE certified tests according to list A of the European Directive for IVDs (98/79/EC) and are under supervision by the responsible European governmental authority. The plasmas were found to be negative on the tested parameters. However, since no test can completely rule out the presence of blood borne diseases these control plasmas have to be handled as potentially infectious material.

Bibliography

1. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 1004-8
2. Bertina RM, Koelemann BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 369: 64-7.
3. Zöller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. Lancet 1994; 343: 1536-8.
4. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. Lancet 1995; 346: 1133-4.
5. Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbinati P, Gavasso S, Cefalo P, Girolami A. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. Blood 2002; 99: 1938-42.
6. Wilmer M, Stocker C, Bühler B, Conell B, Calatzis A. Improved distinction of factor V wild-type and factor V Leiden using a novel prothrombin-based activated protein C resistance assay. Am J Clin Pathol 2004; 122:836-42
7. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA,Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by Arg^{506}Gln mutation in factor Va. Lancet 1994; 343: 1361-2.
8. Cooper PC, Hampton KK, Makris M, Abuzenadah A, Paul B, Preston FE. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. Br J Haematol 1994; 88: 201-3.
9. Price DT, Ridker PM. Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective. Ann Intern Med 1997; 127: 895-903.
10. Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Aiach M. A rapid screening method for factor V Arg^{506} Gln mutation. Blood Coag Fibrinol 1995; 6: 245-8.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. NCCLS Document H21-A2; vol 11 No 23.

Registered as
DSM Nutritional Products Ltd Branch Pentapharm
CH-4002 Basel/Switzerland
T +41 61 706 48 48
pentapharm@pentapharm.com, www.pentapharm.com

Pefakit® APC-R Factor V Leiden

pentapharm

REF 502-01 **IVD** **A usage diagnostique *in-vitro***

CE

Utilisation prévue et application

Pefakit® APC-R Factor V Leiden est un test de coagulation fonctionnel servant à déterminer la résistance à la protéine C activée (APC-R) provoquée par la mutation du facteur V Leiden (FV:Q^{506}).

Introduction

La résistance à la protéine C activée (APC) constitue la plus fréquente déficience héréditaire associée à la thrombose veineuse profonde. Plus de 95% du phénotype de la résistance à l'APC peut s'expliquer par la mutation du facteur V Leiden [1,2,3,4,5,6]. Cette déficience est provoquée par une mutation dans le gène du facteur V où l'acide aminé Arg 506 est remplacé par un reste de Gln [2,3,7]. La déficience hétérozygote (het) multiplie le risque thrombotique par un facteur de 5 à 10, la déficience homozygote (hom) par un facteur de 50 à 100 [5,8,9].
Le phénotype de la déficience en facteur V (FV) Leiden est détecté par des tests plasmatiques fonctionnels [1] et la détermination du génotype se fait par technologie PCR [10].

Principe de la méthode

Pefakit® APC-R Factor V Leiden est un test de coagulation plasmatique fonctionnel qui diffère des autres tests fonctionnels de résistance à l'APC en agissant spécifiquement au niveau du complexe de prothrombinase. Il est basé sur un activateur de prothrombine FVa-dépendant, isolé de venin de serpent.
La force et la spécificité du test sont améliorées par l'élimination des éventuelles perturbations par des facteurs en amont de la cascade de coagulation et l'indépendance au calcium. Toute interférence de UFH, LMWH ou pentasaccharide dans l'échantillon sanguin est exclue par l'addition de polybrène (inhibiteur d'héparine) aux réactifs 1 et 2.
Le plasma du prélèvement est prédilué dans le réactif 4 (plasma dilué) et incubé à 37 °C avec de l'activateur FV de venin de serpent *(RVV-V de Daboia russelli)* pour convertir le FV en FVa. La coagulation est déclenchée par l'addition d'un activateur de prothrombine FVa-dépendant du venin de *Notechis scutatus* en l'absence de calcium. Les temps de coagulation sont enregistrés et le rapport (temps de coagulation en présence d'APC/ temps de coagulation en l'absence d'APC) est calculé.

Réactifs

Réactif	Contenu
R1	**APC / RVV-V (+APC) Reagent** (APC, RVV-V, Polybrene, Hepes, BSA) 3 flacons (lyophilisat, à reconstituer dans 2.0 ml d'eau déionisée par flacon)
R2	**RVV-V (-APC) Reagent** (RVV-V, Polybrene, Hepes, BSA) 3 flacons (lyophilisat, à reconstituer dans 2.0 ml d'eau déionisée par flacon)
R3	**PTA Reagent** (Activateur de prothrombine, EDTA, Hepes, BSA) 3 flacons (lyophilisat, à reconstituer dans 4.0 ml d'eau déionisée par flacon)
R4	**Dilution Plasma** (Plasma humain, traité) 3 flacons (lyophilisat, à reconstituer dans 2.0 ml d'eau déionisée par flacon)

Incuber les solutions reconstituées R1-R4 dans des flacons fermés pendant 30 min à température ambiante et agiter délicatement avant utilisation. **Attention:** En cas d'incubation prolongée, le réactif R4 peut, en raison de sa forte teneur en protéines, montrer une séparation de phases qui se manifeste par une solution transparente à la surface de laquelle se trouve une fine couche blanchâtre. Cela peut être faussement interprété en tant que coagulation. Il faut donc veiller absolument à rendre le réactif homogène et opaque par agitation douce juste avant utilisation.

Matériaux requis mais non fournis

- Eau déionisée
- Pipettes graduées (1000–5000 µl)
- Instruments de coagulation automatiques ou semi-automatiques employant des méthodes de détection mécanique ou optique.

Remarque: En utilisant des instruments de coagulation automatiques ou semi-automatiques, il faut toujours se référer au manuel d'utilisation du fabricant ou demander un protocole d'adaptation détaillé.

Stockage et stabilité

La trousse fermée et stockée entre 2 et 8 °C peut être utilisée jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette.

Stabilité des réactifs après reconstitution:

Réactif	Stabilité	
R1	–20 °C	6 mois
	2–8 °C	14 jours
	15–25 °C	24 heures (on-board)
R2	–20 °C	6 mois
	2–8 °C	14 jours
	15–25 °C	24 heures (on-board)
R3	–20 °C	6 mois
	2–8 °C	14 jours
	15–25 °C	24 heures (on-board)
R4	–20 °C	6 mois
	2–8 °C	14 jours
	15–25 °C	24 heures (on-board)

Les réactifs congelés doivent être décongelés à 37 °C et agités délicatement avant utilisation. Ne congeler qu'une fois.

Contrôles qualité

Utiliser Pefakit® APC-R Factor V Leiden Controls (REF 502-21) comme référence de contrôle pour la validation du test. Le contrôle négatif ou «wild-type» (neg) présente une réponse normale à l'APC, alors que le contrôle hétérozygote (het) répond à la présence du type hétérozygote de la mutation FV:Q^{506}. Une séquence de contrôle doit être effectuée avec chaque série de test.
Pour la préparation, l'utilisation et l'interprétation des contrôles, se référer aux instructions et indications concernant les valeurs limites certifiées sur la notice d'emballage de la trousse de contrôle correspondante.

Distributeur en France : CRYOPEP 83, rue Yves Montand, 34080 Montpellier

Des temps de coagulation différents sont obtenus selon les différents types d'instruments et leur principe de détection du thrombus. Si l'on obtient des valeurs en dehors des limites certifiées (rapport), il faut procéder à une vérification complète des réactifs et répéter l'analyse. Si le problème persiste, il faut procéder à une vérification complète des instruments et répéter l'analyse.

Prise de sang et préparation des échantillons

Le patient doit être au repos pendant 10 min avant la prise de sang. Collecter soigneusement le sang soit dans 104 mM soit 129 mM de citrate de sodium (proportions en volume 9+1). Mélanger délicatement le sang et l'anticoagulant tout de suite après la prise en évitant la formation de mousse. Centrifuger immédiatement à plus de 2000x g pendant au moins 20 min à température ambiante. Veiller à éviter toute contamination du plasma par la couche plaquettaire lorsque le plasma est séparé des cellules. En général, n'utilisez pas d'échantillon de plasma hémolytique.
Pour le stockage, congeler rapidement des aliquotes de plasma non dilué à –70 °C. Ne congeler qu'une fois. Eviter les cycles de congélation et décongélation à répétition. Pour assurer une perte négligeable de l'activité des facteurs de coagulation labiles et l'absence de cryoprécipité, la décongélation doit se faire rapidement (en 5 min) au bain-marie à 37 °C. Pour plus d'informations, cf. NCCLS document H21-A2 [11].
Stabilité des échantillons non dilués (plasma):

–80 °C	au moins 1 an
–20 °C	2 mois
2–8 °C	24 heures
15–25 °C	4 heures

Procédé

Préparer les réactifs et les échantillons comme mentionné précédemment. Mélanger délicatement l'échantillon décongelé pour l'homogénéisation en évitant la formation de mousse. Déterminer le temps de coagulation +APC (temps de coagulation en présence de protéine C activée), le temps de coagulation –APC (temps de coagulation en l'absence de protéine C activée) et calculer le rapport selon le tableau suivant:

		+APC	– APC
	plasma d'exemple ou contrôle	30 µl	30 µl
R4	**Dilution Plasma**	20 µl	20 µl
		Mélanger avant d'utiliser	Mélanger avant d'utiliser
R1	**APC/RVV-V (+APC) Reagent**	50 µl	–
R2	**RVV-V (-APC) Reagent**	–	50 µl
	Incubation	**3 min, 37°C**	**3 min, 37°C**
R3	**PTA Reagent**	50 µl	50 µl
		déterminer le temps de coagulation	déterminer le temps de coagulation
	Calcul du rapport	**Rapport =** $\frac{\text{Temps de coag. +APC}}{\text{Temps de coag. –APC}}$	

Interprétation des résultats

La différentiation entre échantillon homozygote, hétérozygote et négatif est basée sur les valeurs limites typiques pour les rapports, comme on les détermine avec les échantillons des patients génotypés (cf. tableaux suivants). Ceux-ci peuvent varier selon le laboratoire, l'appareil et la charge. Par conséquent il est recommandé d'effectuer des séries de mesure avec des échantillons connus de plasma génotypé, afin de fixer individuellement des valeurs limites et Cutt-offs pour chaque laboratoire et chaque instrument (éventuellement aussi pour chaque charge).

Valeurs attendues

Les valeurs limites typiques de plasmas de patients à génotype PCR sur différents appareils sont présentées dans le tableau ci-dessous.

KC-4/-10 A™ micro		
Génotype FV:Q^{506}	n	Limites (min/max)
Négatif	99	≥ 3.0
Hétérozygote	166	1.3–1.9
Homozygote	25	0.9–1.1

BCS® (Behring Coagulation System)		
Génotype FV:Q^{506}	n	Limites (min/max)
Négatif	143	≥ 3.0
Hétérozygote	170	1.4–2.2
Homozygote	27	0.9–1.1

CA-1500 / CA-7000		
Génotype FV:Q^{506}	n	Limites (min/max)
Négatif	235	≥ 3.0
Hétérozygote	56	1.5–1.8
Homozygote	2	1.0–1.1

ACL 9000™		
Génotype FV:Q^{506}	n	Limites (min/max)
Négatif	127	≥ 3.0
Hétérozygote	119	1.4–2.1
Homozygote	24	0.9–1.2

STA® C		
Génotype FV:Q^{506}	n	Limites (min/max)
Négatif	134	≥ 2.9
Hétérozygote	83	1.3–1.8
Homozygote	27	0.9–1.1

AMAX CS-190		
Génotype FV:Q^{506}	n	Limites (min/max)
Négatif	74	≥ 3.0
Hétérozygote	62	1.2–2.3
Homozygote	10	0.9–1.1

Lors de l'utilisation de ces tableaux, les restrictions suivantes doivent être considérées:

1. Ici, il s'agit d'exemples et **non** de limites de référence ou Cut-offs garantis par le fabricant.
2. Certains facteurs perturbateurs (voir «limites et interférences») peuvent causer des valeurs de rapport qui ne peuvent pas être attribuées clairement à un génotype assigné, ou des temps de coagulation qui dépassent le temps de détection maximal admis sur l'instrument. Dans ces cas, une clarification plus précise au moyen de PCR et la détermination de facteurs individuels est inévitable.

Sensibilité et spécificité

Avec les échantillons testés jusqu'à présent, Pefakit® APC-R Factor V Leiden a montré une sensibilité et une spécificité de 100% pour la mutation de FV:Q^{506} hétérozygote et homozygote, comme on a pu le démontrer par BCS® (n=340), KC-4/-10 A™ micro (n=290), CA-1500/CA-7000 (n=293), ACL 9000™

(n=270), STA® C (n=244) et AMAX CS-190 (n=146).
De par sa technique de détection fonctionnelle, le test est supposé détecter également d'autres mutations de FV menant au phénotype de APC-R. Toutefois, leur prévalence est très faible comparé à la mutation du FV Leiden.

Précision et Reproductibilité

Avec 2 échantillons de plasma génotypé (nég/hét), on a effectué une série de 25 mesures le même jour sur 2 systèmes analytiques différents entièrement automatisés (BCS®, CA-500). Le coefficient de variation (CV) était inférieur à 5% dans les deux cas.
Lors d'une autre étude effectuée sur un appareil STA® C, on a réalisé une série de 10 tests par jour sur 5 jours consécutifs, chacun avec un contrôle hétérozygote et un contrôle négatif (wild-type). Pour les temps de coagulation et le rapport du jour même et tout au long des 5 jours, on a obtenu un CV ≤5.0 pour le contrôle négatif et <3.0 pour le contrôle hétérozygote.
Les valeurs mesurées durant les 5 jours étaient comprises entre les valeurs suivantes :

	C1 FV-L Contrôle négatif			C2 FV-L Contrôle hétérozygote		
	+APC(s)	-APC(s)	Rapport	+APC(s)	-APC(s)	Rapport
min	132.9	24.2	5.3	39.2	25.4	1.5
max	166.3	25.7	6.7	42.6	27.7	1.6

Limites et interférences

Aucune différence significative n'a été observée en utilisant des échantillons de plasma frais ou congelé, puis décongelé. De même, l'utilisation de plasma citraté tamponné ou non tamponné n'a pas d'incidence sur les résultats.
Il n'y a pas d'influence significative sur le rapport ou la sensibilité du test en cas de déficience en fibrinogène, prothrombine, FVIII, FX, ATIII, protéine C ou protéine S (jusqu'à 100%) ou d'excès en fibrinogène, FVIII, ATIII ou TFPI (jusqu'à 5 fois la valeur normale). Le test n'est pas influencé par l'utilisation d'échantillons de sang hémolytique ou d'échantillons contenant des résidus plaquettaires si on utilise des méthodes mécaniques. Par contre, les méthodes optiques peuvent être influencées par des échantillons hémolysés ou lipémiques. Les anticorps de Lupus anticoagulants n'influencent pas le test.
Une forte déficience en facteur V (<50%) par contre peut produire des temps de coagulation très élevés et des rapports en dehors des limites spécifiées, entraînant une perte de sensibilité. La présence d'aprotinine (inhibe l'APC utilisée dans le test) et de protamine dans le sang du patient peut considérablement raccourcir les temps de coagulation, ce qui peut également entraîner une perte de sensibilité.
L'addition de polybrène ne perturbe pas la mesure de plasmas de patients sous héparine jusqu 'à des concentrations ≤2 IU/ml de UFH et LMWH et ≤2 μg/ml de pentasaccharide. L'effet des inhibiteurs directs de thrombine (DTI) tels que l'hirudine ou l'argatroban n'est par contre pas neutralisé par le polybrène. Ainsi, les plasmas de patients sous DTI présentent des temps de coagulation considérablement plus longs et une distinction correcte entre les différents génotypes n'est plus possible.
Après l'administration d'aprotinine, de protamine ou d'inhibiteurs directs de thrombine, il est donc recommandé soit d'attendre 24 h avant la prise de sang pour le test Pefakit® APC-R, soit de détecter la mutation de FV Leiden par PCR.

Précautions

Chaque unité de donneur utilisée pour la préparation du plasma de dilution (R4) a été testée quant à la présence d'anticorps contre le HIV 1 et 2, d'anticorps contre le virus de l'hépatite C, d'anticorps contre le tréponème pâle ainsi que de l'antigène de surface de l'hépatite B et du génome de l'hépatite C et HIV 1 (PCR), le résultat du test devant être négatif. Les tests utilisés à cet effet sont des tests certifiés CE selon la liste A des Directives IVD Européennes (98/79/CE) et sont soumises au contrôle des autorités responsables. Toutefois, comme aucun test ne peut exclure totalement la présence de maladies transmissibles par le sang, ce réactif doit être considéré comme potentiellement infectieux et manipulé en conséquence.

Bibliographie

1. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 1004-8
2. Bertina RM, Koelemann BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature 1994; 369: 64-7.
3. Zöller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. Lancet 1994; 343: 1536-8.
4. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. Lancet 1995; 346: 1133-4.
5. Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbinati P, Gavasso S, Cefalo P, Girolami A. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. Blood 2002; 99: 1938-42.
6. Wilmer M, Stocker C, Bühler B, Conell B, Calatzis A. Improved distinction of factor V wild-type and factor V Leiden using a novel prothrombin-based activated protein C resistance assay. Am J Clin Pathol 2004; 122:836-42
7. Greengard JS, Sun X, Xu X, Fernandez JA,Griffin JH, Evatt B. Activated protein C resistance caused by $Arg^{506}Gln$ mutation in factor Va. Lancet 1994; 343: 1361-2.
8. Cooper PC, Hampton KK, Makris M, Abuzenadah A, Paul B, Preston FE. Further evidence that activated protein C resistance can be misdiagnosed as inherited functional protein S deficiency. Br J Haematol 1994; 88: 201-3.
9. Price DT, Ridker PM. Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective. Ann Intern Med 1997; 127: 895-903.
10. Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Aiach M. A rapid screening method for factor V $Arg^{506} \rightarrow$ Gln mutation. Blood Coag Fibrinol 1995; 6: 245-8.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. NCCLS Document H21-A2; vol 11 No 23.

Registered as
DSM Nutritional Products Ltd Branch Pentapharm
CH-4002 Basel/Switzerland
T +41 61 706 48 48
pentapharm@pentapharm.com, www.pentapharm.com